

THESIS

MARBURG

1965

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

**Nachweis körpereigener und
pharmakologischer Substanzen
in Gewebezellen
mit Hilfe des Ultraviolett-Mikroskopes**

CANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Jürgen Niessing

aus Kiel

Marburg 1965

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Pharmakologischen Institut in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

**Nachweis körpereigener und
pharmakologischer Substanzen
in Gewebezellen
mit Hilfe des Ultraviolett-Mikroskopes**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

in der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Jürgen Niessing

aus Kiel

Marburg 1965

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 16. 2. 1965
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. H. Hensel
Referent: Prof. Dr. M. Siess
Correferent: Prof. Dr. W. Schmid

I. EINLEITUNG

II. METHODIK

- A. Beschreibung des Mikroskopes
- B. Bedienung
 - 1. Einstellung und Justierung -- Fehlermöglichkeiten
 - 2. Belichtungszeiten bei verschiedenen Wellenlängen
 - 3. Bestimmung der Absorptionsspektren der untersucht. Subst.
- C. Herstellung der Präparate
 - 1. Fixierte Präparate
 - 2. Unfixierte Präparate
 - 3. Paraffinschnitte
 - 4. Gefrierschnitte
 - 5. Färbungen
 - 6. Die verschiedenen Einschlußmedien

III. VERSUCHSERGEBNISSE

- A. Untersuchungen an Mäusenieren
 - 1. Normalbild
 - 2. Speicherungsversuche an der Niere mit Carmin
 - 3. Versuche zum Nachweis von Pharmaka in der Niere
- B. Untersuchungen an der Leber von Mäusen
 - 1. Normale Leber
 - 2. Speicherungsversuche an der Leber mit Carmin
 - 3. Versuche zum Nachweis von Pharmaka in der Leber
 - 4. Veränderungen des Nukleinsäuregehaltes in den Leberzellen unter dem Einfluß von Pharmaka
- C. Untersuchungen an der Milz von Mäusen
- D. Untersuchungen an der Herz- und Zwerchfellmuskulatur von Meerschweinchen und Mäusen

IV. DISKUSSION

V. ZUSAMMENFASSUNG



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Um eine Aussage über die Beschaffenheit von Zellen und Geweben unter physiologischen und pathologischen Bedingungen machen zu können, hat man sich, neben zahlreichen anderen Methoden, mit dem UV.-Mikroskop eine spezifische Eigenschaft gewisser Zellelemente zu Nutze gemacht, nämlich die der Eigenabsorption im Ultraviolettbereich. So zeigen die DNS und die RNS ein Maximum der Absorption bei 260 m μ , neben den Nukleinsäuren weisen in geringerem Grade auch Proteine, die reich an Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin sind, ein Absorptionsmaximum bei 280 m μ auf, desgleichen ATP bei 260 m μ .

Das UV.-Mikroskop bietet die Möglichkeit, Nukleinsäuren in den Zellkernen quantitativ zu bestimmen; damit entfallen die Veränderungen von Zellstrukturen, die durch das herkömmliche Färbungsverfahren hervorgerufen wurden; auch ist das Bindungsverhältnis des Farbstoffes mit den Substraten unbekannt, sodaß eine genaue Mengenbestimmung derselben schwieriger ist. Deswegen scheint es kaum verwunderlich, daß mit dem Jahre 1936, als Caspersson die theoretischen und technischen Voraussetzungen für mikrospektrophotometrische Untersuchungen schuf, sich die Ultraviolettmikroskopie in erster Linie den biologisch so bedeutsamen Nukleinsäuren und deren Verteilung in der Zelle zuwandte. Besonders Caspersson und Sandritter haben sich im vergangenen Jahrzehnt um die Verbesserung in der Methodik der UV.-Mikrospektrophotometrie verdient gemacht.

Die Einwirkung von Pharmaka auf Verschiebungen im Nukleinsäuregehalt der Zelle ist bis jetzt mit dem UV.-Mikroskop noch nicht bearbeitet worden, es scheint hier ein wesentliches Arbeitsfeld der UV.-Mikroskopie zu bestehen; allerdings müßte hierfür eine zusätzliche Meßeinrichtung geschaffen werden, die vergleichbare Untersuchungen gestattet. Diemer hat bereits auf diese Möglichkeit hingewiesen.

Ein weiterer Anwendungsbereich des UV.-Mikroskopes in der Pharmakologie könnte im Nachweis von ultraviolettabsorbierenden Substanzen in den Körperzellen liegen. Von Diemer wurde dies an isolierten Leukocyten und Ascitestumorzellen untersucht und die Vorbedingungen für einen Nachweis näher aufgeführt. Während Diemer an lebenden isolierten Zellen arbeitete, befaßt sich

die vorliegende Arbeit ausschließlich mit toten Objekten, die sowohl in fixiertem als auch in unfixiertem Zustand zur Untersuchung kamen. Die Beobachtungen von lebenden Zellen wurden in einer Nährlösung vorgenommen, die durch ihren niedrigen Brechungsindex oft zu erheblichen Streulichtschwärzungen führte, deswegen mußte zunächst nach einem optimalen Eindeckungsmittel für Gewebsschnitte gesucht werden. Das von der Firma Leitz entwickelte UV.-Mikroskop wurde außerdem zur Klärung folgender Fragestellungen herangezogen:

1. Können im UV.-Bereich absorbierende pharmakologische Substanzen im Zellinneren solcher Organe nachgewiesen werden, die auf Grund früherer Untersuchungen die Fähigkeit zur Anreicherung oder Speicherung körperfremder Stoffe gezeigt haben?
2. Wie verhalten sich zelleigene, im UV.-Bereich absorbierende Substanzen (DNS, RNS) hinsichtlich ihrer Form, Verteilung und Quantität unter chronischer Einwirkung von Pharmaka?
3. Ist es möglich, ATP in der quergestreiften Muskulatur des Herzens und des Zwerchfells nachzuweisen und zu lokalisieren?

III. Methodik

A. Beschreibung des UV.-Mikroskopes

Es soll hier nur ein Auszug des schon von Diemer (1962) ausführlich beschriebenen UV.-Mikroskopes wiedergegeben werden. Als Lichtquelle des UV.-Mikroskopes der Firma Leitz dient eine Xenonlampe, deren Strahlen über einen Eintrittsspalt in den Geradsicht-Spiegelmonochromator gelangen; das von hier ausgehende divergente Strahlenbündel wird von der Planfläche eines Umlenkprismas auf den Kollimatorspiegel gelenkt, der es als Parallelbündel einem Dispersionsprisma zuführt. An der Grenzfläche des Prismas wird das Bündel in Parallelbündel verschiedener Wellenlänge aufgefächert. Aus dem Austrittsspalt kommend, wird der Strahl über einen Tubus und einen Mikrospiegel-Kondensor dem Objekt zugeleitet. In dem Strahlengang des Mikroskopes befindet sich ein Bildumwandler, der Beobachtungen im UV.-Bereich ermöglicht. Wird der Bildumwandler aus dem Strahlengang gezogen, so fällt die Abbildung auf eine Mattscheibe senkrecht über dem Objekt, hier lassen sich direkte Beobachtungen im sichtbaren Licht durchführen; eine ebenfalls dort angebrachte photographische Kassette ermöglicht Aufnahmen im ultraviolettten und im sichtbaren Spektralbereich. Auf dem Monochromator befinden sich zwei Trommeln, die zur Einstellung der jeweils gewünschten Wellenlänge und Spaltbreite benutzt werden. Über einen Umschwunghebel läßt sich - dem Spektrum entsprechend - ein Glas- oder ein Quarzglasprisma einstellen.

B. Bedienung

1. Einstellung und Justierung --- Fehlermöglichkeiten

Für die Beobachtungen im UV.-Bereich wurden Quarzglasobjektträger und Quarzglasdeckgläser, als Immersionsmittel wasserfreies Glycerin ($D = 1,44$) verwendet. Auf den Objektträger und das Deckglas wurde jeweils ein Tropfen Glycerin gebracht, ebenso auf das herausnehmbare Objektiv und auf den Kondensor. Vor der Zündung der Xenonlampe wurde das aufgelegte Präparat dem Objektiv und dem Kondensor bis zum Ineinanderfließen der aufgetragenen Tropfen genähert. Die Justierung erfolgte bei einer Wellenlänge von $550 \text{ m}\mu$; auf der Mattscheibe müssen sich die beiden gezündeten

Elektroden direkt gegenüberstehen, dies wurde gegebenenfalls durch einen Regulierknopf am seitlichen Schaltgehäuse richtig eingestellt. Im UV.-Licht wurde dann das Objekt scharf eingestellt und bei geschlossener Sehfeldblende die Kondensorschraube derart betätigt, daß sich der Sehfeldblendenrand scharf im Blickfeld einstellte. Die Werte zur Regulierung der am Quertubus angebrachten Schiebehülsen konnte in Abhängigkeit von der gewünschten Wellenlänge aus einer Tabelle entnommen werden. Als Fehlerquellen kommen in erster Linie mangelhafte Justierung, Flackern des Lichtes und unscharfe Einstellung des Sehfeldblendenrandes in Frage. Um eine spezifische Absorption im UV.-Bereich nachweisen zu können, darf die am Quertubus angebrachte Blende nicht geschlossen werden, da dies zum Auftreten von unspezifischen und strukturbedingten Absorptionen führt.

2. Belichtungszeiten bei verschiedenen Wellenlängen

Im Verlaufe unserer Untersuchungen wurden etwa 350 Aufnahmen mit Ilford-Platten angefertigt, wobei eine exakte Bestimmung der Belichtungszeiten, die in den verschiedenen Wellenbereichen notwendig waren, durch folgende Umstände erschwert wurde: Die Lichtintensität der Xenonlampe änderte sich nach jeder Zündung; wahrscheinlich durch die Alterung der Xenonlampe bedingt, ließ die Strahlungsintensität etwas nach; ein ab und zu auftretendes Flackern der Lampe wurde durch wiederholte Zündungen beseitigt. Schließlich änderte sich die Strahlendurchlässigkeit der einzelnen Gewebe mit der Art der Vorbehandlung. Präparate, die in absolutem Alkohol fixiert worden waren und über Methylbenzoat, Benzol und Benzolparaffin in Paraffin eingebettet wurden, benötigten eine längere Belichtungsdauer als die nur in Formalin fixierten Präparate. Alle Schnitte, die von uns im UV.-Mikroskop untersucht wurden, hatten eine Dicke von 7,5 μ , eine Veränderung der Strahlendurchlässigkeit mit der Schnittdicke wurde damit weitgehend ausgeschlossen.

Im folgenden seien einige Belichtungszeiten angeführt, die wir in den einzelnen Spektralbereichen benutzten:

Tabelle I

Wellenlänge in μ	Belichtungszeit in Sek.	Wellenlänge in μ	Belichtungszeit in Sek.
230	600	340	0,1
240	240	390	0,04
250	12-90	400	0,04
260	5-10	410	0,04
270	3-5	420	0,04
280	3	430	0,04
290	2	490	0,5
300	1	510	3
310	0,5	520	7
320	0,5	530	9
330	0,1-0,2		

3. Bestimmung der Absorptionsspektren der untersuchten Substanzen

Die von uns benutzten pharmakologischen Substanzen wurden mit dem Spektralphotometer Zeiss PQ II auf ihre Absorptionsmaxima und -minima im UV.-Bereich untersucht. In geeigneten Konzentrationen (10^{-4} bis 10^{-7} g/ml) maßen wir die Extinction in Quarzglasküvetten ($d = 1$ cm) gegen destilliertes Wasser. Die in Form von Kurven aufgezeichneten Absorptionsspektren sollten uns später zur Auffindung der injizierten Substanzen in den Zellen der verschiedenen Organe dienen. In der vorliegenden Arbeit werden nur die Maxima der pharmakologischen Agenzien angeführt (s. Tab. II).

Tabelle II

Substanz	Maximum μ	Konzentration g/ml	Extinction $d = 1$
Methylenblau	1.) 293	10^{-5}	1.) 0,832
	2.) 665		2.) 1,520
	1.) 280	10^{-5}	1.) 0,340
Carmin	2.) 330		2.) 0,142
	3.) 510		3.) 0,101
Kongorot	1.) 240	10^{-5}	1.) 0,258
	2.) 345		2.) 0,255
	3.) 500		3.) 0,400

Fortsetzung Tabelle II

Phenolrot	1.) 260	10^{-5}	1.) 0,100
	2.) 440		2.) 0,269
Phenolphthalein			
a.) neutral	230	4×10^{-6}	1,062
b.) basisch	1.) 230		1.) 0,749
	2.) 550		2.) 0,326
Periston	230	4×10^{-3}	0,785
2-Acetoamino- fluoren	280	10^{-6}	0,085
Dimethylamino- azobenzolum	1.) 260	10^{-7}	1.) 0,101
	2.) 410		2.) 0,146
Bisaethyleniminoben- zochinon (Sulfonat)	335	10^{-6}	0,593
Bisaethylenimino- benzochinon (Bayer E 39)	340	10^{-6}	0,441
Esidrix	270	5×10^{-6}	0,457
Salyrgan	270	2×10^{-7}	0,412
Diamox	270	5×10^{-6}	0,345
Leukomycin	280	10^{-5}	0,481
Madribon	270	10^{-5}	0,732
Orisul	260	10^{-5}	0,482
Aristamid	260	10^{-5}	0,193
Persantin	1.) 285	$1,5 \times 10^{-5}$	1.) 0,914
	2.) 410		2.) 0,250
Luminal	240	10^{-5}	0,344
Megaphen	1.) 255	$0,143 \times 10^{-4}$	1.) 1,380
	2.) 310		2.) 0,170
Macrodex	kein Max.		

C. Herstellung der Präparate

Die Versuche wurden an etwa 100 erwachsenen weißen Mäusen männlichen Geschlechtes des gleichen Inzuchtstammes durchgeführt. Die Tötung durch Dekapitation erfolgte ohne vorherige Narkose um evtl. mögliche Strukturveränderungen durch Narkosewirkung in der Zelle zu vermeiden und um eine höchstmögliche Blutleere in den zu untersuchenden Organen zu erhalten. Nach rasch durchgeführter Sektion wurden die Organe in unterschiedlicher Weise weiterbehandelt.

1. Fixierte Präparate

Die Wahl der Fixierungsflüssigkeiten richtete sich nach dem angestrebten Schneideverfahren, dementsprechend wurden die Organteile, die als Gefrierschnitte zur Untersuchung kommen sollten, für mindestens 5 Std. in 10 %iges Formalin gebracht. Kontrollpräparate und die für Paraffinschnitte bestimmten Organe wurden über Alkohol, Methylbenzoat und Benzol in leicht erwärmtes (40°C) Benzolparaffin gebracht, danach erfolgte im Vakuum die luftblasenfreie Einbettung in flüssiges Paraffin.

2. Unfixierte Präparate (Fixierung durch Kältetrocknung)

Um einer möglichen vorzeitigen Diffusion in die Fixierungsflüssigkeit der evtl. in den Zellen gespeicherten Pharmaka zu begegnen, wurden unmittelbar nach der Sektion Organstückchen mittels Kohlensäureschnee rasch durchgefroren und in diesem Zustand in das Innere eines Kryostaten gebracht. Dort wurden bei einer Raumtemperatur von -20°C vier Schnitte mit einem ebenfalls unterkühlten Quarzglasobjektträger aufgefangen. Durch Unterlegen einer Fingerkuppe wurden zwei der Schnitte zum kurzen Auftauen und damit zur besseren Haftung gebracht. Die Präparate blieben, um eine weitgehende Austrocknung zu gewährleisten, noch einige Stunden im Kryostaten liegen. Eine weitere von uns benutzte Methode zur Verwendung unfixierten Materials war die der Vakuumgefriertrocknung mit anschließender Paraffineinbettung. Zu diesem Zweck brachten wir die nach Abtötung des Tieres eilig präparierten Organstückchen in Isopentan, das mittels flüssiger Luft auf -150°C unterkühlt worden war. Nach anschließender 48 Std. während der Gefriertrocknung im Vakuum wurden die Objekte dort luftblasenfrei in Paraffin eingebettet.

3. Paraffinschnitte

a. Fixierte Präparate: Im Wesentlichen kamen nur die in Alkohol fixierten Organteile der Leber und Niere zur Paraffineinbettung. Die Schnitte von 7,5 μ Dicke wurden jeweils quer zur Längsachse der Organe geführt; auf einem entfetteten Quarzglasobjektträger aufgezogen, gelangten die Schnitte nach 12-stündiger Trocknung im Brutschrank zur Entparaffinierung. In gleicher Weise wurde mit den Kontrollpräparaten verfahren, die, auf gewöhnliche Glasobjektträger gebracht, anschließend mit Hämalaun-Eosin gefärbt wurden.

b. Unfixierte Präparate: Unter II C 2 ist schon kurz auf die Gefriertrocknung unfixierten Materials - in diesem Falle Herz- und Zwerchfellmuskulatur von Meerschweinchen und Mäusen - eingegangen worden. Die in Paraffin eingebetteten Organe mußten entsprechend der uns interessierenden Strukturen parallel zur Längsrichtung der Muskelfasern geschnitten werden.

4. Gefrierschnitte

a. Fixierte Präparate: Die Mehrzahl der im UV.-Mikroskop untersuchten Präparate (Niere, Leber, Milz) sind nach Formolfixation am Gefriermikrotom geschnitten worden. Zu diesem Zweck brachten wir das zu schneidende Organ, nachdem es kurze Zeit in destilliertem Wasser gelegen hatte, unter Mitnahme von etwas Flüssigkeit auf den Gefriertisch. Durch oftmaliges kurzes Öffnen des Ventiles wurde das Präparat durch die ausströmende Kohlensäure gleichmäßig und nicht zu stark durchgefroren. Die Schnitte fingen wir in destilliertem Wasser auf, wo sie sich meist ohne Schwierigkeiten auf einen Quarzglasobjektträger aufziehen ließen.

b. Unfixierte Präparate: An dem gewöhnlichen Gefriermikrotom ließen sich von frischen, nicht fixierten Präparaten keine verwertbaren Schnitte gewinnen; aus diesem Grunde brachten wir die unmittelbar nach der Sektion mit Kohlensäureschnee durchgefrorenen Organe (Leber, Niere, Milz) in ein abgeschlossenes System, den Kryostaten. Dort gelangen uns mühelos Schnitte von 7,5 μ Dicke, die noch in gefrorenem Zustand mit einem Quarzglasobjektträger aufgefangen wurden. Nach erfolgter Trocknung und Eindeckung (s. II C 6) Betrachtung im UV.-Mikroskop.

5. Färbungen

Um eine lichtmikroskopische Kontrolle zu den am UV.-Mikroskop erhobenen Befunden zu erhalten, wurden die Paraffinschnitte (nach Alkoholfixation) von Niere und Leber mit Hämalaun oder Hämalaun-Eosin gefärbt. Danach Eindeckung mit Rhenohistol.

6. Die verschiedenen Einschlußmedien

Die beiden wichtigsten Forderungen, die man in der UV.-Mikroskopie an ein Einschlußmittel stellen muß, sind:

1. Herabsetzung der Streulichtmenge durch möglichst nahe Angleichung des Brechungsindex an den der Organe.

2. Geringe Eigenabsorption.

Um diesen Forderungen nachzukommen, deckten wir Nieren- und Leberschnitte mit Rhenohistol, Wasser und Glycerin ein. Bei der Betrachtung im UV.-Mikroskop erwies sich das Rhenohistol wegen der hohen Eigenabsorption als völlig unbrauchbar. Wasser zeigte eine stärkere Streustrahlung als Glycerin und verdunstete relativ schnell. Wasserfreies Glycerin kam den obengenannten Bedingungen am nächsten, sodaß die ersten Schnittpräparate mit diesem eingedeckt wurden. Im Verlaufe unserer Bemühungen gelang es, die noch in geringem Maße auftretenden Streustrahlungen zu vermindern, indem wir Chloralhydrat in Glycerin lösten (Jansen). Folgende Mengen einer 100 %igen Chloralhydratlösung wurden zu Glycerin. anhydric. (Merck) gegeben:

5	ml einer 100 %igen Chloralhydratlösung zu 5 ml Glycerin	= 50%
2,5	ml einer 100 %igen Chloralhydratlösung zu 5 ml	" = 33,3 %
2	ml einer 100 %igen Chloralhydratlösung zu 5 ml	" = 28,4 %
1,5	ml einer 100 %igen Chloralhydratlösung zu 5 ml	" = 23,07%
1	ml einer 100 %igen Chloralhydratlösung zu 5 ml	" = 16,6 %
0,5	ml einer 100 %igen Chloralhydratlösung zu 5 ml	" = 9,09%
0,05	ml einer 100 %igen Chloralhydratlösung zu 5 ml	" = 0,99%

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration deckten wir Leberschnitte mit den verschiedenen Lösungen ein, von jedem Präparat wurden Aufnahmen bei 260 mμ und bei 310 mμ hergestellt. Eine Begutachtung der den verschiedenen Konzentrationen entsprechenden Streulichtmengen (z.B. der Grad der Absorptionsschwärzung von Kernmembranen) war nun möglich, s. Abb. 1, 2, u. 3. Den höchsten Brechungsindex schien das 9,09 %ige Gemisch zu haben, weswegen es dann als optimales Einschlußmittel verwendet wurde.

Abbildung 1

Gefrierschnitt ei-
ner Leber bei 260 mu
mit einer 0,99 %igen
Chloralhydratglyce-
rinlösung eingedeckt.
Fixation in 10 %igem
Formalin.

Vergr.: 2250x

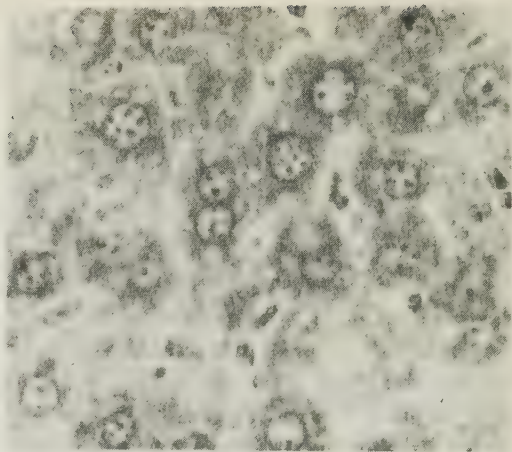


Abbildung 2

Gefrierschnitt einer
Leber bei 260 mu mit
einer 9,09 %igen
Chloralhydratglyce-
rinlösung eingedeckt.
Fixation in 10 %igem
Formalin.

Vergr.: 2250x

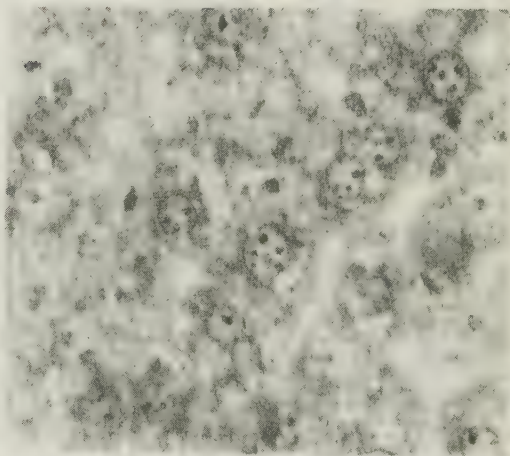
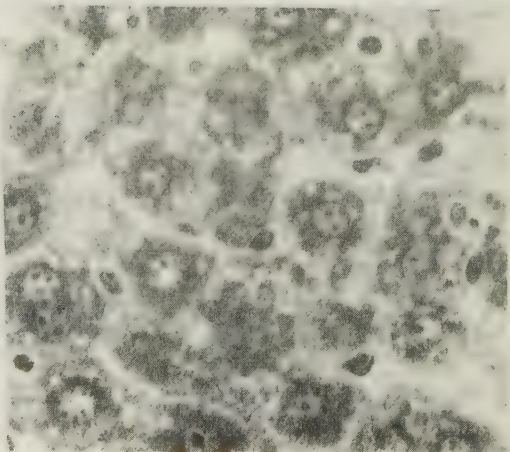


Abbildung 3

Gefrierschnitt einer
Leber bei 260 mu mit
einer 33,3 %igen
Chloralhydratglyce-
rinlösung eingedeckt.
Fixation in 10 %igem
Formalin.

Vergr.: 2250x



III. VERSUCHSERGEBNISSE

A. Untersuchungen an Mäusenieren

1. Normalbild

Betrachtet man einen unbehandelten normalen Nierenschnitt (Abb. 4, 5, 6) bei einer Wellenlänge von 260 m μ im UV.-Mikroskop, so ähnelt dieses Bild in vielen Punkten einem H.-E. gefärbten Nierenpräparat, das man sich in schwarz-weißen Kontrasten vorstellen muß. Die starke Affinität mancher Zellstrukturen zu den Farbstoffen äußert sich im UV.-Mikroskop durch eine erhöhte Absorption. Schon bei flüchtiger Durchsicht fallen zuerst die Zellkerne mit ihren Nukleoli in das Auge - ein Beweis für die ausgesprochene Dominanz der Nukleinsäuren hinsichtlich ihrer Absorption im UV.-Bereich gegenüber den anderen Zellbestandteilen. Einhergehend mit der Änderung der Wellenlänge zum sichtbaren Spektralbereich hin nimmt die Absorption der Kerne von ihrem Maximum bei 260 m μ an zusehends ab, um in dem Bereich zwischen 285-300 m μ zu verschwinden. Die Kerne der Deckzellen müssen die höchste Konzentration an Nukleinsäuren haben, da sie im Vergleich mit den übrigen im Nephron zu findenden Zellkernen die stärkste Absorption aufweisen. Die Zellgrenzen der uns am meisten interessierenden Tubuluszellen sind kaum oder nur sehr schwer zu erkennen, im Protoplasma finden wir sehr kleine diffus verteilte Körnchen, die zwischen 260-290 m μ ebenfalls absorbieren. Recht deutlich ist die Basalmembran der Tubuli zu erkennen; sie zeigt keine spezifische Absorption sondern bleibt im ganzen Spektralbereich wohl infolge Brechung und unspezifischer Absorption sichtbar.

2. Speicherungsversuch an der Niere mit Carmin

Es ist bekannt (Suzuki), daß Carmin nach längerer subcutaner Verabreichung besonders stark in den Tubuli der Niere in Form von Granula gespeichert wird. Die von uns durchgeführten Speicherungsversuche sollten demonstrieren, daß ein uv.-mikroskopischer Nachweis von im Zellinneren angereicherten Substanzen, die im UV.-Bereich ein Absorptionsmaximum aufweisen, grundsätzlich möglich ist. Ein Farbstoff mußte sich hierzu besonders gut eignen, da uns neben dem uv.-mikroskopischen Nachweis die Kontrolle im sichtbaren Spektralbereich gegeben war.

Abbildung 4

Paraffinschnitt einer normalen Niere bei 260 μ nach Alkoholfixation.
Vergr.: 2250x

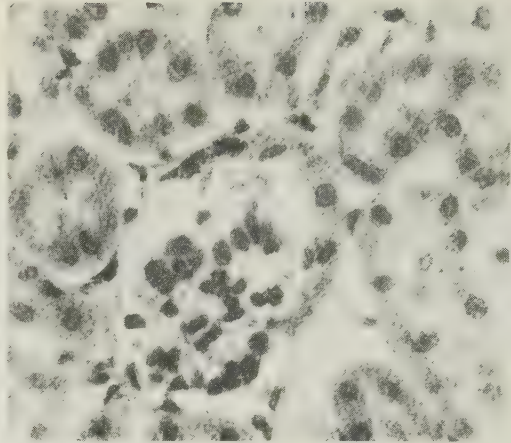


Abbildung 5

Paraffinschnitt einer normalen Niere bei 280 μ nach Alkoholfixation.
Vergr.: 2250x

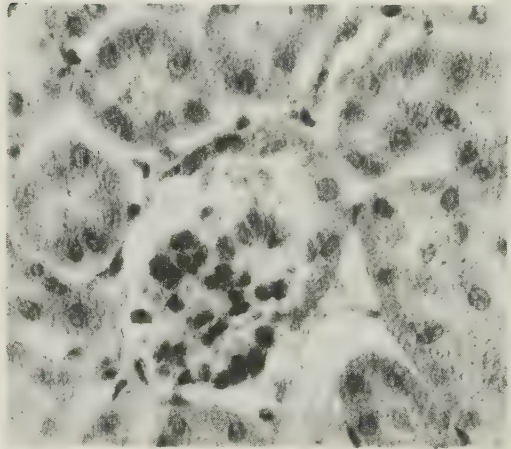
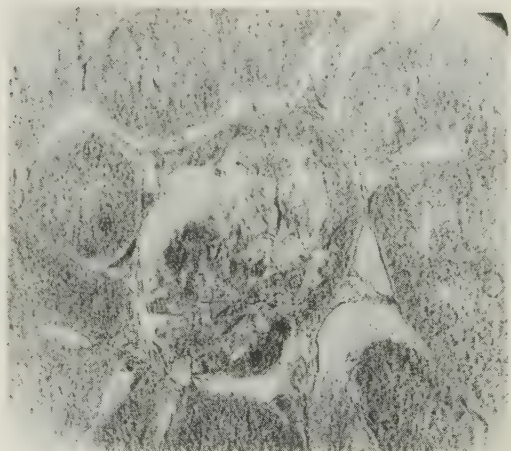


Abbildung 6

Paraffinschnitt einer normalen Niere bei 300 μ nach Alkoholfixation.
Vergr.: 2250x



Zur Bereitung der Carminlösung gaben wir 2,5 g Carmin (Merck) zu 100 ml einer 1 %igen Lithiumcarbonatlösung. Da nach einigen subcutanen Injektionen Nekrosen auftraten, die u. U. auf das Lithiumcarbonat zurückzuführen sind, versetzten wir 100 ml destilliertes Wasser mit 1 g Carmin und gaben einige Tropfen Natronlauge hinzu, nach kurzem Aufkochen im Wasserbad hatte sich das Carmin vollständig gelöst. Die erwähnten toxischen Erscheinungen traten nun nicht wieder auf. Wir benutzten 10 Mäuse als Versuchstiere. Bei einer Tagesdosis von 0,3 ccm der 1 %igen Carminlösung, die wir subcutan injizierten, war nach dem 5. Tage ein eindeutiger Nachweis gespeicherten Carmins möglich. Das Nierenpräparat wurde nach Alkoholfixation und Paraffineinbettung im UV.-Mikroskop auf die spezifischen Absorptionen des Carmins hin untersucht. Entsprechend der hohen Extinction bei 280 mu kam es in diesem Wellenbereich zu einer sehr deutlichen Darstellung von mittel- bis großkörnigen Granula in den Zellen der Tubuli contorti I (Abb. 7-10). Diese spezifischen Schwärzungen verschwanden bei 260 mu fast völlig und traten mit abnehmender Intensität bei 330 mu und im sichtbaren Bereich bei 510 mu wieder auf. Durch lichtmikroskopische Untersuchungen an den mit Hämalaun gefärbten Kontrollpräparaten stellten wir ebenfalls eine Speicherung des roten Carmins in den genannten Tubuli fest.

Aus den Untersuchungen von K. Fr. Diemer geht hervor, daß ein uv.-mikroskopischer Nachweis von in Zellen gespeicherten pharmakologischen Substanzen nur dann möglich ist, wenn diese in einer Konzentration von wenigstens 0,1 % - 1 % vorliegen. Bei unserem Speicherungsversuch wurde diese Bedingung offenbar erfüllt. Versuche mit anderen Farbstoffen zeigten negative Ergebnisse, woraus zu schließen ist, daß diese entweder überhaupt nicht in den Tubuluszellen angereichert werden, oder daß sie in ihrer Konzentration unter der Nachweisgrenze geblieben sind. Diese Versuche wurden an 9 Mäusen mit Kongorot (100 mg/kg/Tag), Phenolrot (100 mg/kg/Tag) und Phenolphthalein (100 mg/kg/Tag) durchgeführt. Die Injektionen erfolgten subcutan, nach 10 Tagen wurden die Tiere getötet und ohne Fixierung im Kryostaten geschnitten. Wie schon erwähnt, konnten wir keine Speicherung nachweisen.

Abbildung 7

Paraffinschnitt einer Niere bei 260 μ nach 6-tägiger Carmininjektion. Fixation in Alkohol.
Vergr.: 2250x

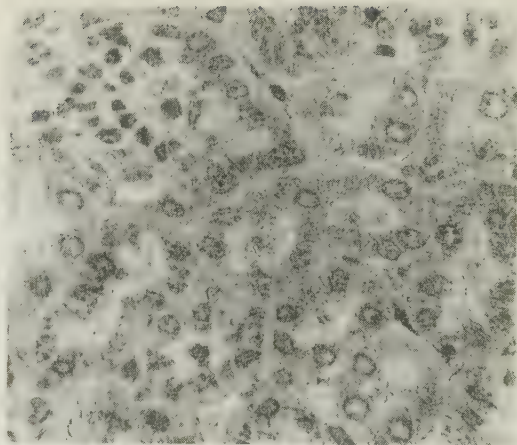


Abbildung 8

Paraffinschnitt einer Niere bei 280 μ nach 6-tägiger Carmininjektion. Fixation in Alkohol.
Vergr.: 2250x

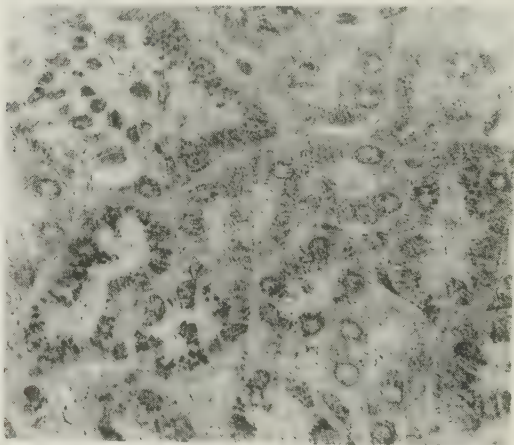


Abbildung 9

Paraffinschnitt einer Niere bei 280 μ nach 6-tägiger Carmininjektion. Fixation in Alkohol.
Vergr.: 4500x

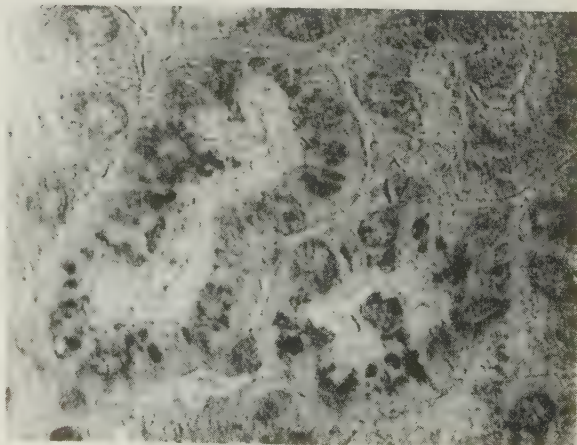
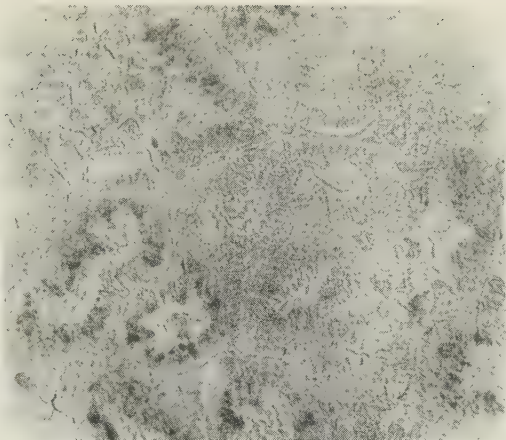


Abbildung 10

Paraffinschnitt einer Niere bei 300 mu nach 6-tägiger Carmininjektion. Fixation in Alkohol. Vergr.: 2250x



3. Versuche zum Nachweis von Pharmaka in der Niere

a. Diuretica

Auf der Suche nach einem geeigneten Pharmakon, von dem man theoretisch annehmen konnte, daß es in der Niere angereichert oder gespeichert würde, kamen in erster Linie Substanzen in Frage, die in der Niere selbst ihren Wirkungsort haben und an den Vorgängen der Sekretion und Resorption maßgeblich beteiligt sind. Wir verwendeten zuerst das Quecksilberdiureticum Salyrgan. Salyrgan hat einen breiten, von 270 mu bis 280 mu reichenden Absorptionsgipfel, die Extinction ist im Verhältnis zur Konzentration sehr hoch (bei 2×10^{-7} g/ml ist $E = 0,412$). Als Versuchstiere dienten wiederum Mäuse; wir injizierten grundsätzlich subcutan mit einer Dosis von 50 mg/kg, diese über dem therapeutischen Bereich liegende Konzentration durfte nicht überschritten werden, da die Tiere oft, besonders nach intravenösen Injektionen, verstarben. Bei der Nachuntersuchung zeigten sich in diesen Fällen fast immer massive Nekrosen der Tubulusepithelien. In orientierenden Versuchen wollten wir feststellen, welcher Zeitpunkt nach der Injektion für unsere Untersuchungen am günstigsten ist, d.h. wann Salyrgan - vorausgesetzt, daß es überhaupt in den Tubuli angereichert wird - in seiner maximalen Konzentration vorliegt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere in Abständen von $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, $1\frac{1}{2}$, 2, 3 und 4 Stunden nach der Injektion getötet. Wir fixierten die Nieren in Formalin und Alkohol mit nachfolgender Paraffineinbettung.

Um der Möglichkeit einer vorzeitigen Herauslösung des Salyrgans durch Fixation, Nachbehandlung, Paraffineinbettung, etc. zu begegnen, wiederholten wir diese Versuche, wobei eine Niere in fixiertem Zustand (Formalin), die andere unfixiert im Kryostat geschnitten wurde. In weiteren Versuchen behandelten wir die Tiere 6 Tage lang mit einer Dosis von 50 mg/kg täglich. Nach dem 2., 4. und 6. Tag wurde jeweils ein Teil der Mäuse 1 Stunde nach der letzten Injektion getötet. Auch von den Nieren dieser Tiere wurden - wie oben schon beschrieben - fixierte und unfixierte Gefrierschnitte sowie Paraffinschnitte angefertigt.

Die Untersuchungen am UV.-Mikroskop ergaben, daß sich die Nierenpräparate nach einmaliger Injektion von Salyrgan $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{2}$ Stunde nach erfolgter Verabreichung praktisch in keinem Punkte von dem histologischen Bild einer normalen Niere unterschieden. Eine Stunde nach der Injektion zeigte sich in den apikalen Bereichen der Tubuluszellen unter dem Bürstensaum ein meist zirkulärer Streifen, der mit einem Maximum bei 270 und 280 m μ absorbierte (Abb. 11-13). Später, zwei und drei Stunden nach der Injektion war von dieser spezifischen Absorption nichts mehr zu sehen, an ihrer Stelle traten nun, was besonders in den nativen Gefrierschnitten zu erkennen war, in den Lichtungen der Tubuli schaumige Massen auf, die teilweise der Absorption des Salyrgans entsprachen, zum anderen aber von netzartigen Strukturen durchsetzt waren, die über den ganzen von uns durchmessenen Spektralbereich (bis 800 m μ) absorbierten.

Aus Untersuchungen von F. Timm und M. Arnold (1959) mit histochemischen Methoden (physikalische Entwicklung in der Niere entstandener argyrophiler Reaktionsprodukte des Salyrgans und Darstellung des Quecksilbers im Sulfid-Silberbild) geht hervor, daß das Quecksilber des Salyrgans im Sulfid-Silberbild zunächst in Form von groben Körnchen in den basalen Teilen der Hauptstückepithelien, eine Stunde nach der Injektion hingegen als feine Linie in oder unter dem Bürstensaum zu finden ist. Diese Befunde stimmen mit den unseren insofern überein, als wir das Salyrgan ebenfalls eine Stunde nach der Injektion unter dem Bürstensaum der Hauptstückzellen nachweisen konnten, was für eine tubuläre Ausscheidung des nicht veränderten Salyrgans spricht. Ein Nachweis des Salyrgans in den basalen Teilen

Abbildung 11

Gefrierschnitt einer Niere bei 270 mu nach einmaliger Injektion von Salyrgan. Fixation in 10 %igem Formalin.

Vergr.: 2250x

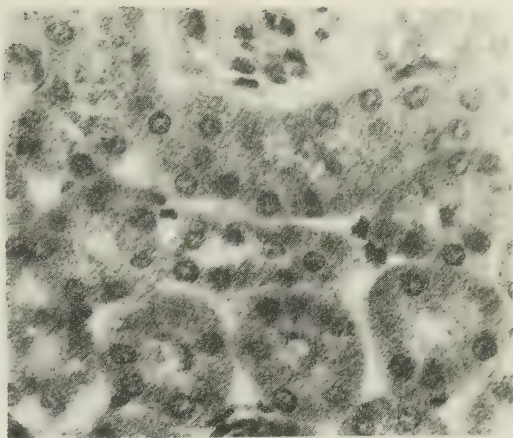


Abbildung 12

Gefrierschnitt einer Niere bei 280 mu nach einmaliger Injektion von Salyrgan. Fixation in 10 %igem Formalin.

Vergr.: 2250x

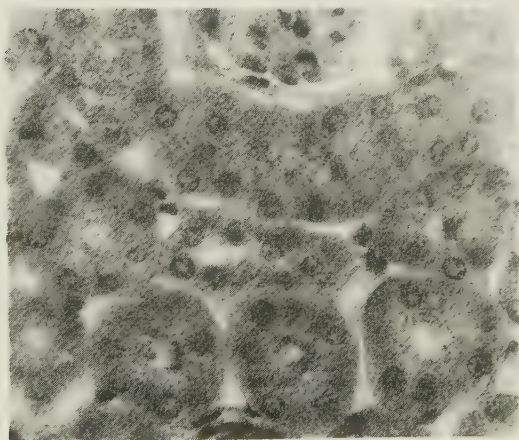
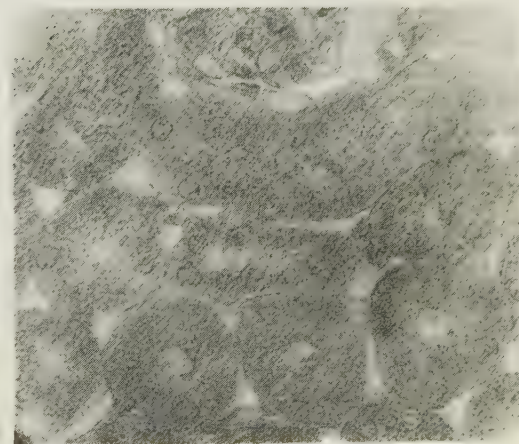


Abbildung 13

Gefrierschnitt einer Niere bei 300 mu nach einmaliger Injektion von Salyrgan. Fixation in 10 %igem Formalin.

Vergr.: 2250x



der Tubuluszellen gelang uns hingegen nicht. Die erwähnten schaumigen Massen in den Lumina zwei und drei Stunden nach der Injektion wurden auch von Timm und Arnold beobachtet und als schwefelhaltige Umsetzungsprodukte des Hg-Diureticums gedeutet. Eine Speicherung des Salyrgans nach längerer Verabreichung (2, 4 und 6 Tage) wie wir es am Beispiel des Carmins gesehen haben, war nicht zu beobachten; neben Zellnekrosen stellten wir auch hier die oben beschriebene Anreicherung des Salyrgans eine Stunde nach der letzten Injektion fest. Im folgenden seien die übrigen von uns benutzten Pharmaka angeführt, bei denen ein uv.-mikroskopischer Nachweis in der Niere mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte.

Tabelle III

Substanz	Art der Applikation	Dosierung pro Tag	Behandlungsdauer	Zeit v. d. letzt. Injekt. -- Tötung
2-Acetoamino-fluoren	subcut.	1x150mg/kg	6 Tage	4 Stunden
Dimethylaminoazobenzolium	subcut.	1x150mg/kg	6 Tage	4 Stunden
Bisäthyleniminobenzochinon (Sulfonat)	subcut. intrav.	1x50-100mg/kg	2 Tage	20 Min.
Bisäthyleniminobenzochinon	subcut.	1x50-150mg/kg	5 Tage	1 Std., 5 Std.
Leukomycin	subcut. intrav. intrap.	1x1000mg/kg	1 Tag, 5 Tage	15 Min., 45 Min.
Madribon	subcut. intrav.	1x200-300mg/kg	4 Tage	15 Min.
Orisul	subcut. intrav.	1x100-200mg/kg	1 Tag, 4 Tage	15 Min.
Persantin	intrav. intrap.	1x50-300mg/kg	bis zu 6 Tg.	10 Min., 45 Min.
Luminal	subcut. intrav.	1-2x 100-200mg/kg	bis zu 6 Tg.	15 Min., 60 Min.
Megaphen	intrav.	1x1000mg/kg	1 Tag	15 Min.
Macrodex	intrav.	1x1-3ml	1 Tag, 3 Tage	30 Min.
Periston	intrav.	1x1-3ml	1 Tag, 3 Tage	30 Min.

B. Untersuchungen an der Leber von Mäusen

1. Normalbild

Im histologischen Präparat einer normalen Leber der Maus ergeben sich während des Ablaufes eines Tages sehr unterschiedliche Bilder. Durch eine rhythmische Funktion der Leber bedingt, ist abends, auf dem Höhepunkt der assimilatorischen Phase, ein Maximum der Glycogenspeicherung zu bemerken, mittags hingegen erreicht die Glycogenstapelung ihren niedrigsten Punkt (Siess, Schmidt, Oehmig, Kirchner). Diese funktionellen Änderungen im Glycogenbestand der Leber äußern sich bei Betrachtung im UV.-Mikroskop derart, daß bei glycogenreichen Präparaten das Protoplasma aller Leberzellen mit sehr kleinen, diffus verteilten Granula angereichert erscheint, die von 260-300 m μ eine Absorption mit abnehmender Intensität zeigen. Die meist dreizipfeligen Kupffer'schen Sternzellen sind durch ihre geringere Größe und durch ihre stärkere Absorption im Bereich von 260-280 m μ leicht zu erkennen (Abb. 14-16).

Das Bild einer glycogenarmen Leber weist deutliche Unterschiede hinsichtlich der Morphologie und Lokalisation des Cytoplasmas in der Zelle auf, dieses ist vorwiegend perinucleär und an der Zellwand zu finden, meist durch schmale Protoplasmabrücken, die durch den übrigen optisch leeren Teil der Zelle verlaufen, miteinander verbunden (Abb. 17-19). Die Absorption des Protoplasmas nimmt hier ebenfalls von 260-300 m μ kontinuierlich ab. Unterschiede in der Form, Anzahl und im Nukleinsäuregehalt der Nukleoli waren nicht zu beobachten; hingegen fiel sowohl bei den glycogenreichen als auch bei den glycogenarmen Schnitten auf, daß die Zahl der Nukleoli in den Leberzellkernen von der Läppchenperipherie über die Intermediärzone bis zum Läppchenzentrum hin zusehends abnahm und kontinuierlich mit der Verringerung der Zahl einer Vergrößerung der Nukleoli einherging (Abb. 28).

Eine Leberverfettung beobachteten wir bei Mäusen, die 2 Tage gehungert hatten; optisch inaktive Tröpfchen von unterschiedlicher Größe waren diffus in das Protoplasma der Leberzellen eingestreut (Abb. 20-22).

Abbildung 14

Gefrierschnitt einer
normalen glycogenrei-
chen Leber bei 260 mu.
Fixation in 10 %igem
Formalin.

Vergr.: 2250x

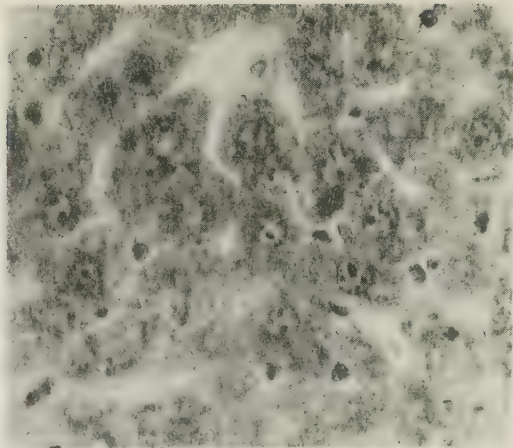


Abbildung 15

Gefrierschnitt einer
normalen glycogenrei-
chen Leber bei 280 mu.
Fixation in 10 %igem
Formalin.

Vergr.: 2250x

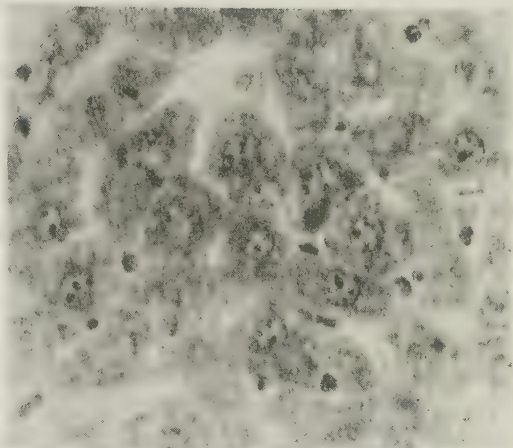


Abbildung 16

Gefrierschnitt einer
normalen glycogenrei-
chen Leber bei 300 mu.
Fixation in 10 %igem
Formalin.

Vergr.: 2250x

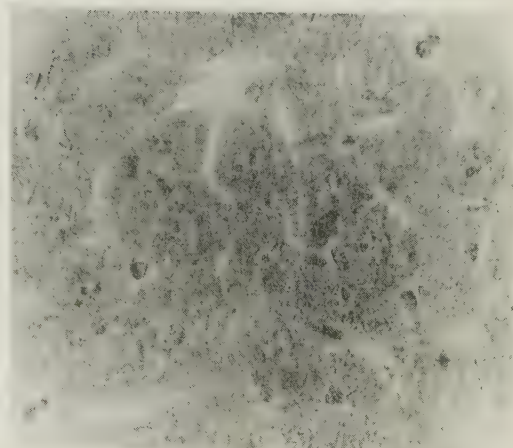


Abbildung 17

Gefrierschnitt einer
normalen glycogenar-
men Leber bei 260 mu.
Fixation in 10 %igem
Formalin.
Vergr.: 2250x

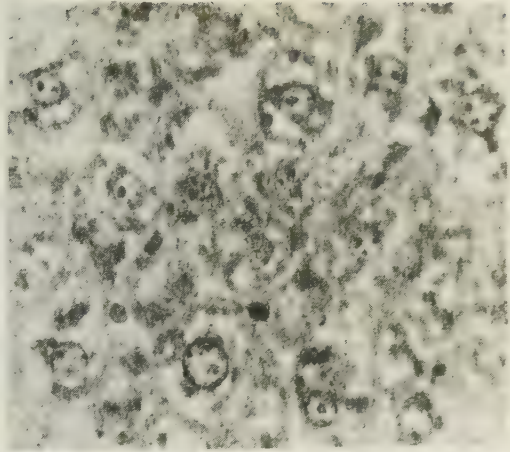


Abbildung 18

Gefrierschnitt einer
normalen glycogenar-
men Leber bei 280 mu.
Fixation in 10 %igem
Formalin.
Vergr.: 2250x

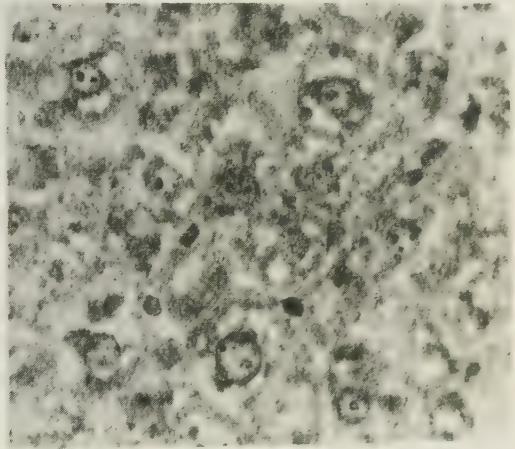


Abbildung 19

Gefrierschnitt einer
normalen glycogenar-
men Leber bei 300 mu.
Fixation in 10 %igem
Formalin.
Vergr.: 2250x

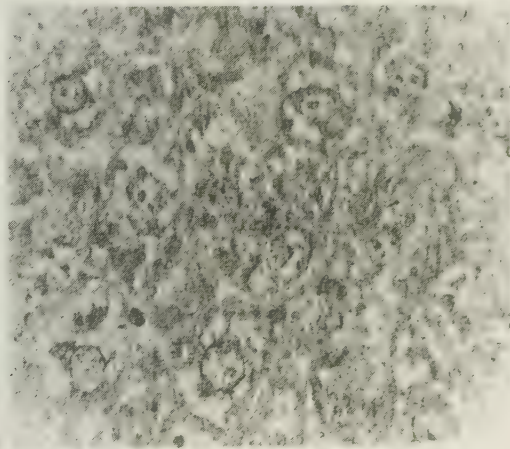


Abbildung 20

Gefrierschnitt einer
Leber mit Fetttropfen
nach 2 Tagen Hunger
bei 260 μ m. Fixation
in 10 %igem Formalin
Vergr.: 2250x

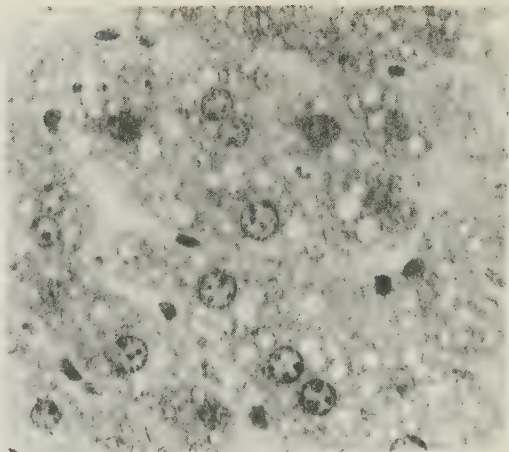


Abbildung 21

Gefrierschnitt einer
Leber mit Fetttropfen
nach 2 Tagen Hunger
bei 280 μ m. Fixation
in 10 %igem Formalin.
Vergr.: 2250x

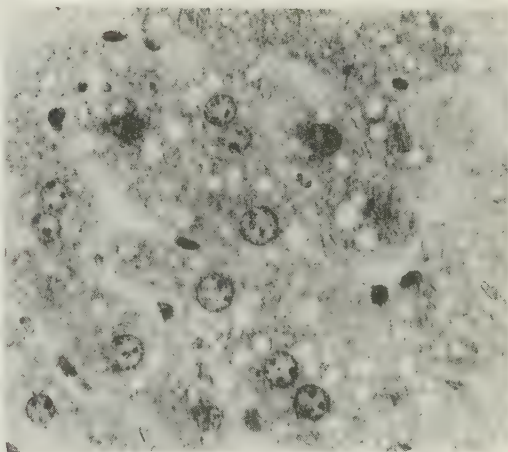
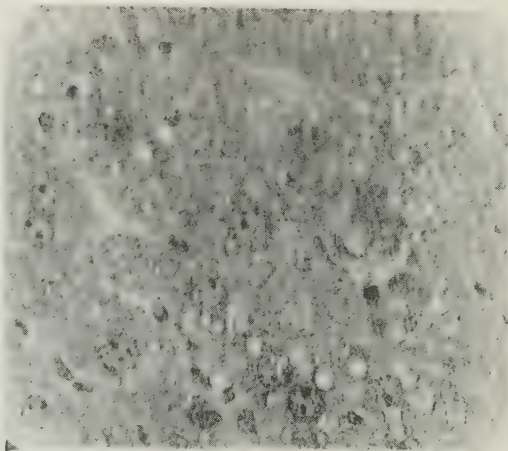


Abbildung 22

Gefrierschnitt einer
Leber mit Fetttropfen
nach 2 Tagen Hunger
bei 300 μ m. Fixation
in 10 %igem Formalin.
Vergr.: 2250x



2. Speicherungsversuche in der Leber mit Carmin

Wir injizierten das Carmin 19 Tage lang subcutan mit einer Dosis von 200 mg täglich. Eine Stunde vor der Tötung verabreichten wir noch einmal die gleiche Dosis intravenös. Die Leber wurde in 10 %igem Formalin fixiert und schließlich am Gefriermikrotom geschnitten. Licht- und uv.-mikroskopische Untersuchungen ergaben, daß eine Speicherung des Carmins nur in den Kupffer'schen Sternzellen nachzuweisen war -- erkennbar an der maximalen Absorptionsschwärzung bei 280, 330 und 510 m μ . Die schon am Normalpräparat auftretende starke Absorption der Kupffer'schen Sternzellen bis zu 280 m μ erschwerten uns häufig eine sichere Beurteilung, ob nun ein Farbstoff oder ein Pharmakon gespeichert wurde oder nicht.

3. Versuche zum Nachweis von Pharmaka in der Leber

Es sollen hier nur die Versuche besprochen werden, bei denen wir eine Speicherung von Pharmaka in der Leber feststellen konnten. Die im übrigen verabreichten Pharmaka mit Behandlungsdauer, Dosis und Schneideverfahren wurden schon bei der Besprechung der Versuche zum Nachweis von Pharmaka in der Niere erwähnt und können dort sowie in Tabelle III nachgelesen werden.

Das Sulfonamid Orisul wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen mit einer Tagesdosis von 100 mg/kg subcutan injiziert, 15 min. vor der Tötung verabfolgten wir 200 mg/kg intravenös. Aus Abb. 23-25 ist zu ersehen, daß es zu einer überaus deutlichen Darstellung der Kupffer'schen Sternzellen kommt, wie wir es vergleichsweise bei den gleichen Wellenlängen am Normalpräparat nie beobachten konnten. Diese hohe Absorption bei 260 m μ , die selbst um 290 m μ noch -- wenn auch mit geringerer Intensität -- gut nachweisbar ist, könnte als durchaus spezifisch für Orisul angesehen werden, da dieses ebenfalls bei 260 m μ ein Absorptionsmaximum aufweist und bei der Wellenlänge von 290 m μ noch etwa $\frac{1}{3}$ der gemessenen maximalen Absorption besitzt. Eine zweite Deutung ist dadurch gegeben, daß das Sulfonamid u.U. die Nukleinsäurekonzentration in den Kernen der Kupffer'schen Sternzellen beeinflussen könnte. Eine Verdichtung oder Erhöhung des Gehaltes an Nukleinsäuren würde eine Verbreiterung der Absorptionsbande hervorrufen, die ihrerseits den relativ hohen Schwärzungsgrad bei 290 m μ erklären könnte (Abb. 29).

Abbildung 23

Gefrierschnitt einer
Leber bei 260 mu nach
4-tägiger Injektion
von Orisul. Fixation
in 10 %igem Formalin.
Vergr.: 2250x

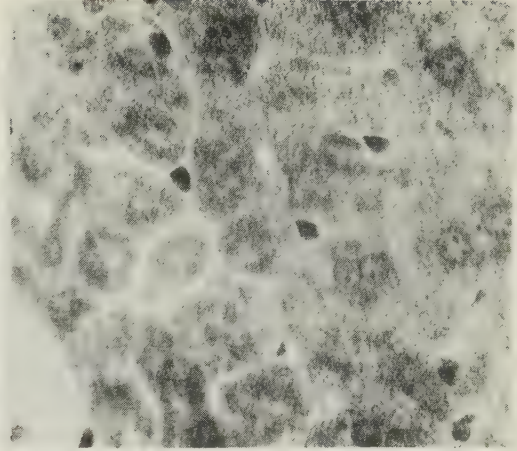


Abbildung 24

Gefrierschnitt einer
Leber bei 290 mu nach
4-tägiger Injektion
von Orisul. Fixation
in 10 %igem Formalin.
Vergr.: 2250x

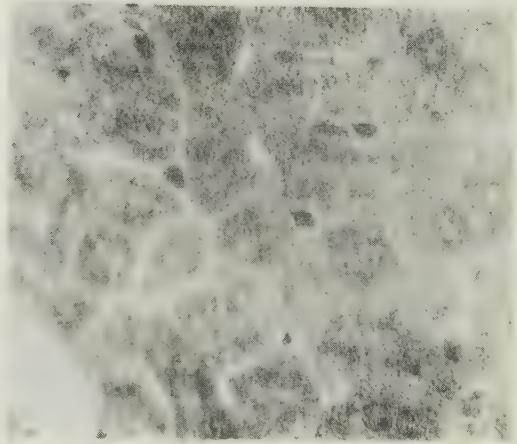
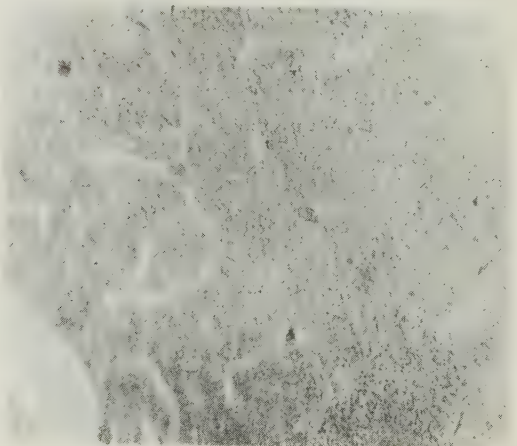


Abbildung 25

Gefrierschnitt einer
Leber bei 300 mu nach
4-tägiger Injektion
von Orisul. Fixation
in 10 %igem Formalin.
Vergr.: 2250x



Nach Injektionen von Periston, einer 4 %igen Lösung von Polyvinyl-Pyrrolidon in physiologischer Kochsalzlösung, gelang uns ebenfalls der uv.-mikroskopische Nachweis einer Speicherung, dieses Mal allerdings in der Leberzelle selbst. Wir injizierten jeweils 2 ml der unverdünnten Peristonlösung 3 Stunden und 1 ml eine halbe Stunde vor der Tötung intravenös. In unfixiertem Zustand wurde die Leber unmittelbar nach der Präparation durchgefroren und im Kryostaten geschnitten. Bei der anschließenden Betrachtung im UV.-Mikroskop ergab sich bezüglich der Form und Verteilung des gespeicherten Peristons ein der diffusen Leberverfettung sehr ähnliches Bild, nur mit dem Unterschied, daß Fettvakuolen keine Absorption im UV.-Bereich zeigen. Mit einer maximalen Absorption bei 250 m μ (Untersuchungen in kürzeren Wellenbereichen waren wegen der zunehmenden Dunkelheit im Blickfeld nicht möglich) fanden wir tropfenförmige Gebilde von unterschiedlicher Größe in das Protoplasma der Leberzellen eingestreut (Abb. 26 und 27). Die Absorption der beschriebenen Vakuolen nahm, ohne noch einmal ein Maximum zu zeigen, bis zu 400 m μ fortwährend ab. Da diese Präparate in unfixiertem Zustand geschnitten worden sind, kommt es zu einer nur umrißhaften Darstellung der Leberzellkerne. In lichtmikroskopischen Untersuchungen am gleichen Präparat konnten wir bei aufmerksamer Betrachtung optisch leere, tropfenförmige Einlagerungen feststellen, die sich nach PAS-Färbungen rot anfärbten, zweifellos handelt es sich hier um die gleiche schon im UV.-Bereich bemerkte Speicherungsform des Peristons. Die im Spektralphotometer ermittelte Extinktionskurve des Peristons gleicht der kontinuierlichen Absorptionsminderung der beschriebenen vakuoligen Einschlüsse zwischen 250 m μ und 400 m μ in allen Punkten. Ein Nachweis gespeicherten Peristons in formalinfixierten Präparaten war trotz 3-tägiger Behandlungsdauer nicht möglich, da dieses offenbar von der Fixierungsflüssigkeit herausgelöst wurde.

Abbildung 26
Unfixierter Leber-
schnitt bei 250 μ
nach Injektionen von
3 ml Periston.
Vergr.: 2250 x

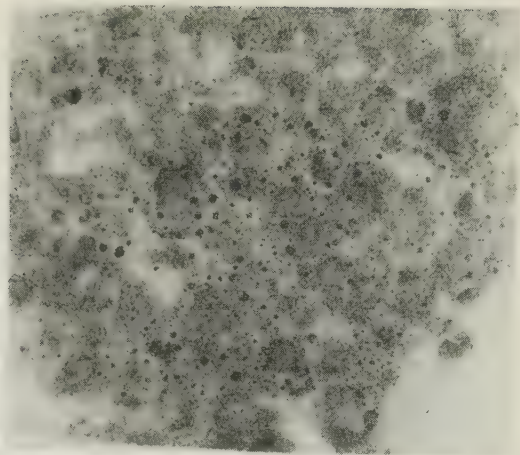
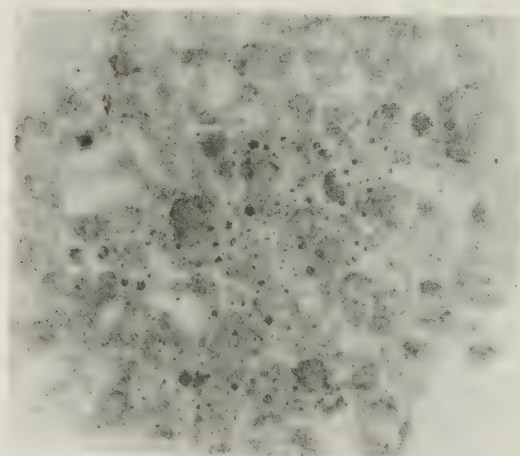


Abbildung 27
Unfixierter Leber-
schnitt bei 270 μ
nach Injektionen von
3 ml Periston.
Vergr.: 2250 x



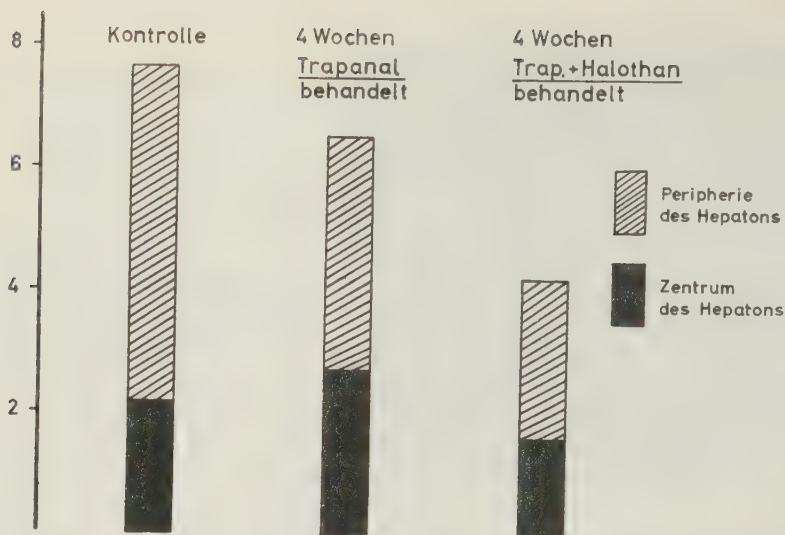
4. Veränderungen des Nukleinsäuregehaltes in den Leberzellen unter dem Einfluß von Pharmaka.

In Versuchsserien, die unabhängig von der vorliegenden Arbeit am gleichen Institut durchgeführt wurden (Schaude, Preis), standen Mäuse 3 und 4 Wochen unter chronischer Zufuhr von Narkotica bzw. Barbituraten.

a. Luminal: Über einen Zeitraum von 4 Wochen wurden Mäuse mit subcutanen Injektionen von Luminal behandelt, die Tagesdosis lag bei 100 mg/kg. In Abständen von jeweils einer Woche wurde ein Teil der Tiere getötet und deren Organe in Formalin fixiert. Wir befaßten uns nur mit uv.-mikroskopischen Untersuchungen an der Leber unter besonderer Berücksichtigung der im UV.-Bereich absorbierenden Kernsubstanzen. Die Herstellung der 7,5 μ dicken Schnitte wurde am Gefriermikroton vorgenommen. Es wurde eingangs schon erwähnt, daß von den zelleigenen, biologisch wichtigen Substanzen die Nukleinsäuren im UV.-Bereich bei 260 m μ die weitaus höchste Absorption aufweisen; aus diesem Grunde müssen Verschiebungen derselben und Veränderungen in ihrem quantitativen Vorkommen mit dem UV.-Mikroskop gut erfaßbar sein. Die Untersuchungen wurden bei einer Wellenlänge von 260 m μ durchgeführt.

Wie am Normalpräparat, so zeigte sich auch bei den Leberschnitten nach 3 und 4 wöchiger Verabreichung von Luminal die Tatsache erneut bestätigt, daß die Nukleoli der Zellkerne von der Läppchenperipherie zum Zentrum hin in der Zahl geringer werden, an Größe hingegen zunehmen. Diese Größenzunahme unterschied sich aber nicht wesentlich von dem gleichgewichtigen unbehandelten Kontrollpräparat. Um die erwähnte gleichsinnige Abnahme der Nukleoli sowohl bei Luminal- als auch bei den Normalpräparaten exakter zu bestimmen, zählten wir die Nukleoli von jeweils 6 mit Hämalaun gefärbten Präparaten im Lichtmikroskop unter Benutzung eines Gitterquadrates aus. Auch hier ergaben sich keine wesentlichen Abweichungen vom Kontrollpräparat.

b. Tripanal: Eine Zunahme von Nukleinsäuren in den Leberzellkernen konnten wir nach 3 und 4 wöchentlich subcutaner Verabreichung von Tripanal beobachten. Die Dosis lag anfangs bei 50 mg/kg/Tag, nach Gewöhnung an das Narkotikum durchschnittlich bei 80 mg/kg. Die Nukleoli der im Läppchenzentrum sich befindenden Kerne waren bei gleicher oder verstärkter Absorptionsschwärzung



Anzahl der Nukleoli pro Kern im Kontrollpräparat, im gleichgewichtigen Trapanalpräparat und im Trapanal-Halothanpräparat.

Abbildung 28

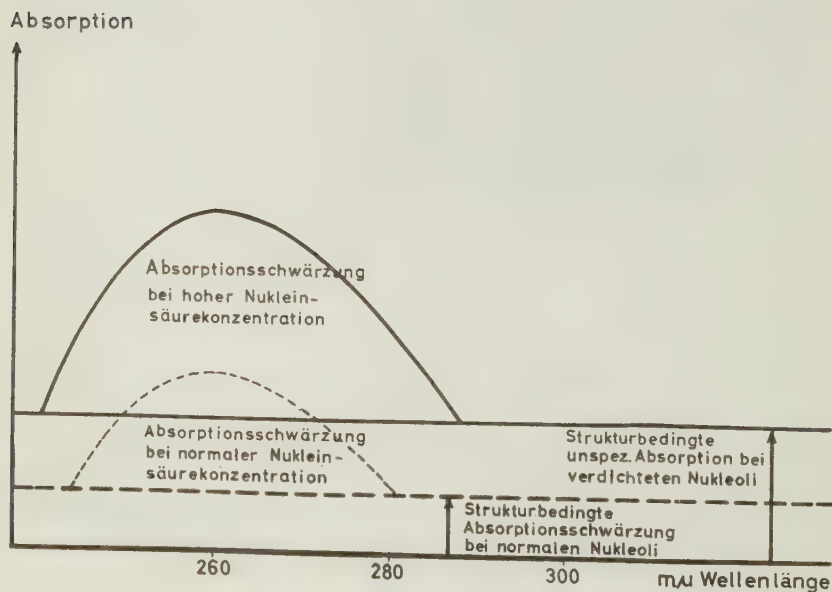


Abbildung 29

etwas größer geworden, ihre Zahl hatte sich verringert. Ähnliche Veränderungen waren in der Läppchenperipherie zu beobachten, wo sich die Zahl der Nukleoli ebenfalls zugunsten ihrer Größe vermindert hatte. Ergänzende Zählungen am gefärbten Präparat bestätigten diesen Befund (Abb. 28).

c. Trapanal-Halothan: In einer anderen Versuchsreihe wurden wiederum Mäuse über 4 Wochen mit einer durchschnittlichen Tagesdosis von 80 mg/kg Trapanal subcutan gespritzt, anschließend, jeweils eine halbe Stunde nach der Injektion inhalierten die Tiere 60 min. lang in einem Exsikkator, der an ein Narkosegerät angeschlossen war und mit 0,8 %igem Halothan durchströmt wurde. Die 7,5 μ dicken formalinfixierten Gefrierschnitte der Leber wurden bei 260 μ im UV.-Mikroskop auf ihren Gehalt an Nukleinsäuren untersucht. Die schon bei den Trapanalversuchen beobachtete Kondensation der Nukleoli trat hier noch deutlicher in Erscheinung; an 6 verschiedenen mit Hämalaun gefärbten Trapanal - Halothanschnitten zählten wir wiederum im Lichtmikroskop mit einem Gitterquadrat die durchschnittliche Anzahl der Nukleoli pro Kern aus und verglichen mit dem Normalpräparat (Abb. 28). Es zeigte sich eine Abnahme der Nukleoli um fast 50 %, woran die Läppchenperipherie stärkeren Anteil hatte als das Läppchenzentrum. Im UV.-Mikroskop konnten wir eine beträchtliche Größenzunahme und eine verstärkte Absorptionsschwärzung der Nukleoli feststellen (Abb. 30 - 33). Es ist auffallend, daß eine deutlich sichtbare Absorptionsminderung dieser Nukleoli erst zwischen 290 μ und 300 μ eintritt, und weiter, daß ein Maximum der Absorption eher bei 280 als bei 260 μ vorliegt.

Abbildung 30

Gefrierschnitt einer
Leber bei 260 mu
nach 4 Wochen Tra-
panal und Halothan.
Vergr.: 2250 x
Fixation in 10 %igem
Formalin.

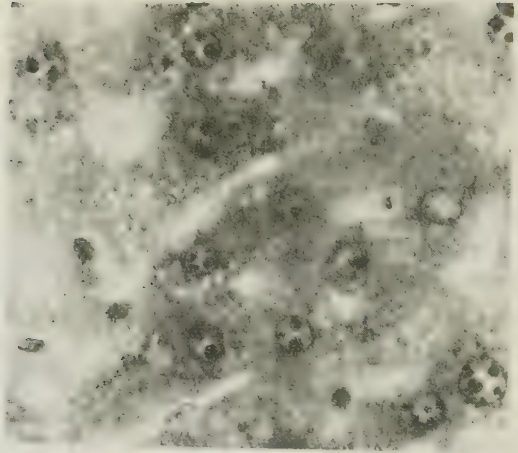


Abbildung 31

Gefrierschnitt einer
Leber bei 280 mu
nach 4 Wochen Tra-
panal und Halothan.
Fixation in 10 %igem
Formalin.
Vergr.: 2250 x

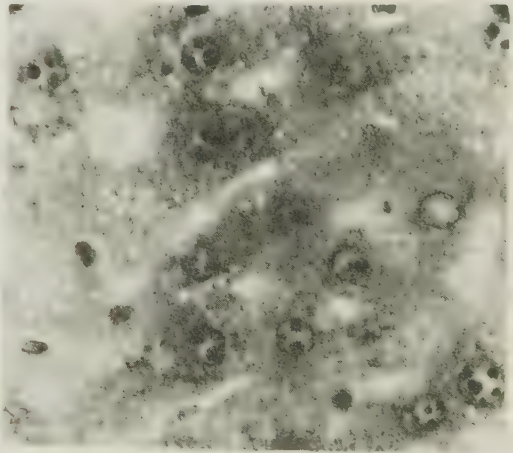
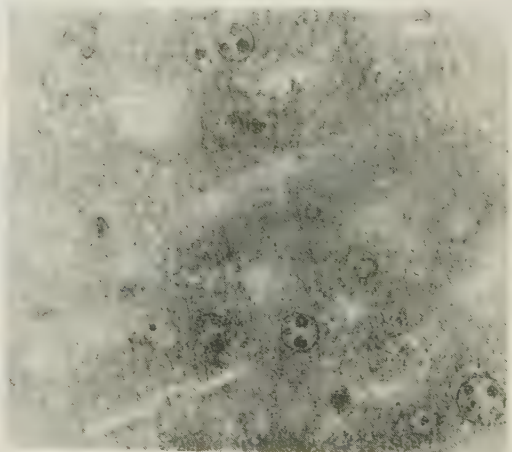


Abbildung 32

Gefrierschnitt einer
Leber bei 300 mu
nach 4 Wochen Tra-
panal und Halothan.
Fixation in 10 %igem
Formalin.
Vergr.: 2250 x



C. Untersuchungen an der Milz von Mäusen

Ein Nachweis von gespeicherten Pharmaka in der Milz ist infolge der schon am normalen Präparat zu findenden starken Absorption des reticulären und lymphatischen Gewebes sowie der Erythrocyten im Bereich von 260 - 300 m μ äußerst schwierig; denn die meisten von uns verwendeten pharmakologischen Substanzen zeigten eben in dem gleichen Wellenbereich ihre Absorptionsmaxima. Aus diesem Grunde waren exakte Beobachtungen an den unfixierten und im Kryostat geschnittenen Milzpräparaten nicht möglich.

Makroskopische Veränderungen der Milz zeigten sich bei der Präparation des Organes. Nach 6-tägigen Injektionen von Dimethyleminoazobenzolum (Buttergelb) mit einer Tagesdosis von 100 mg/kg hatte die Milz eine tiefschwarze Farbe angenommen und war stark vergrößert. Das Milzgewicht war bei allen vier Versuchstieren von durchschnittlich 110 mg auf 240 - 270 mg angestiegen. Eine beträchtliche Abnahme des Milzgewichtes von 110 mg auf 16 - 18 mg beobachteten wir nach 3-tägiger Verabreichung von Bisäthyleniminobenzochinon (Bayer E 39), die Tagesdosis lag hier bei 100 mg/kg. Untersuchungen im UV.-Mikroskop ergeben keine Anhaltspunkte für eine Speicherung von Bisäthyleniminobenzochinon (Bayer E 39), die zwischen 260 und 300 m μ absorbierenden Zellen lagen weniger dicht beieinander und ihre Absorption schien geringer zu sein als die in einem normalen Milzpräparat.

D. Untersuchungen an der Herz- und Zwerchfellmuskulatur von Meerschweinchen und Mäusen

In den folgenden Versuchen sollten die von Caspersson und Thorell beobachtete spezifische Absorption des ATP in den I-Banden des quergestreiften Muskels nachuntersucht werden.

ATP zeigt ein Absorptionsmaximum bei 260 m μ . Es ist im quergestreiften Muskel an drei Stellen lokalisiert; einmal, wahrscheinlich diffus gelöst im Cytoplasma, dann in höherer Konzentration in den Mitochondrien und 3. am Actomyosin, wo es durch Spaltung in ADP und Phosphat die Muskelkontraktion bewirkt. Nach neueren Anschauungen sind etwa 1 - 5 % des gesamten ATP an das Actomyosin gebunden, wo es als sog. aktives ATP zur Verfügung steht, während sich das übrige ATP auf die Mitochondrien und das Cytoplasma verteilt.

Ein uv.-mikroskopischer Nachweis des ATP mit seinem spezifischen

Abbildung 33

Gefrierschnitte bei
260 mu von einer Le-
ber nach 4 Woch. Tra-
panal und Halothen
(re. Bildseite) und
einer unbehandelten
Kontrolleber (li.).
Fixation in 10 %ig.
Formalin.
Vergr.: 5400 x

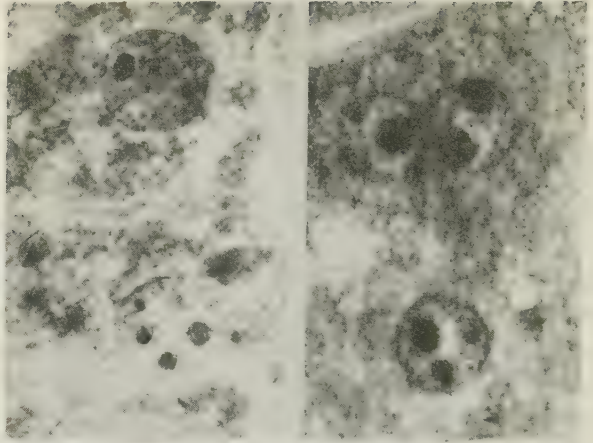


Abbildung 34

Paraffinschnitt ei-
nes Zwerchfells der
Maus bei 260 mu.
Keine Fixation.
Vergr.: 2250 x

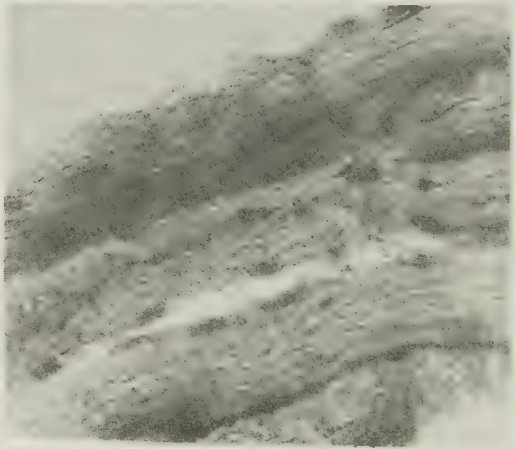
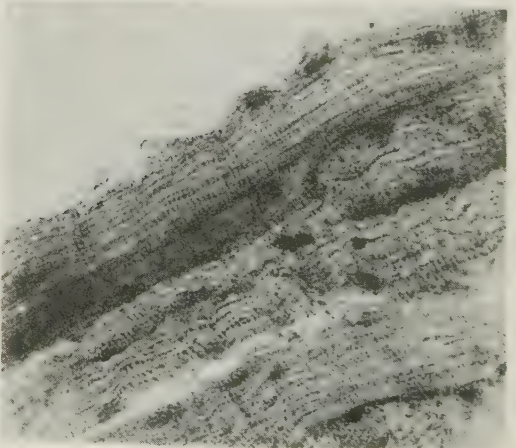


Abbildung 35

Paraffinschnitt ei-
nes Zwerchfelles der
Maus bei 280 mu.
Keine Fixation.
Vergr.: 2250 x



Absorptionsspektrum ist wegen der vorausgehenden Herauslösung desselben schwierig. Aus diesem Grunde wurde ein Stück Herzmuskulatur vom Meerschweinchen und Zwerchfellmuskulatur von der Maus sofort nach der Präparation in von flüssiger Luft umgebenes Isopentan auf -150°C unterkühlt, anschließend Gefriertrocknung im Vakuum und Paraffineinbettung.

Im UV.-Mikroskop beobachteten wir eine deutliche Darstellung der Längs- wie auch der Querstreifung, die aber unspezifisch durch die Struktur bedingt, über den gesamten untersuchten Spektralbereich festzustellen ist, während die Absorption der Kernnukleinsäuren zwischen 260 - 280 $\text{m}\mu$ zu finden ist. Eine besonders scharfe schwarze Bande zeigt sich im Z-Streifen, erkenntlich an den Einziehungen des Sarkolemmis. Die I-Bande erscheint, im Gegensatz zu der relativ dichten Q-Bande, meist hell. Eine spezifische Absorption bei 260 $\text{m}\mu$ bzw. eine Verstärkung der Schwärzung ist aber in keinem Präparat mit Sicherheit von der unspezifischen Absorption zu trennen. Diese Beobachtungen wurden an Präparaten gemacht, in denen das ATP durch Fixation mit BaCl_2 -haltigem Alkohol ausgefällt worden war; aber auch an den unfixierten Präparaten, bei denen das ATP vermutlich herausgelöst wurde, bemerkten wir die gleichen Veränderungen (Abb. 34, 35).

Ein Nachweis des ATP in der Querstreifung der Muskulatur ist nach unseren Befunden nicht möglich, da die unspezifische Schwärzung durch Streuung der in der Querstreifung angeordneten Strukturen zu groß ist.

IV. Materialien

Die Untersuchungen an UV-Mikroskop haben gezeigt, daß ein Nachweis von Verteilungen und überaus in den Anulusepithelien der Niere, in den Kapillaren und Sternzellen und in den Lebergparenchymzellen möglich ist. Voraussetzung hierfür ist, daß diese Substanzen eine Absorptionsschicht in UV-Bereichen haben, die sich von der körpereigenen Struktur unterscheiden (z.B. Carmin) und daß sie bis zu Konzentrationen angereichert werden, die in einer Absorption über die unspezifische Grundabsorption der Zellteilungsstelle hinausgeht. Diese Bedingungen sind einem nach unseren Untersuchungen nur für noch wenige Stoffe vorzuliegen. Es besteht wegen der Möglichkeit, das durch Fixation und Paraffineinbettung aus den Gewebeschritten vor allem Wasser- und lipophilisierte Substanzen herausgelöst werden. Durch die Anfertigung von Metallplatten aus diesen in Hypocriten als anschließender Gefrierbehandlung auf dem Quarzglasobjektträger konnte eine Herauslösung von Thermochemie vermieden werden. Diese Methode kommt ja auch in der Autoradiographie beim Nachweis von Substanzen in Gewebeteilen zur Anwendung. Für einen UV-Mikroskopischen Nachweis müssen die so gewonnenen Präparate der Einbettung mit einem Einbettungsmittel von hohem Brechungsindex bedeckt werden. Wie von uns benutzte Chloroform-Äthermischung, die Wasser enthält, verhindert kaum eine Diffusion von Stoffen aus dem Gewebe, soweit diese nicht an Strukturen gebunden sind. Als wichtigster Punkt für spätere Untersuchungen und daher sehr einer Einbettungsmittel gesucht werden, das einmal, die unspezifische Streuungen zu verhindern, einen hohen Brechungsindex besitzt, zum anderen muß es für UV-Strahlen durchlässig sein sowie Wasser- und lipophilisierte Substanzen nicht aufziehen. Der Brechungsindexbereich, in dem Substanzen nachgewiesen werden können, liegt nach den Untersuchungen von Wiener bei 0,1-5%, wobei 2,5 % die untere Nachweisgrenze überhaupt ist. Unter einem Brechungsindex von 2 u können keine Absorptionsergebnisse mehr verwertet werden, da hierbei durch die unspezifischen Brechungen der verteilten Substanzen verdeckt werden. In UV-Mikroskop ist diese unspezifische Absorption am Fortbestehen der Schwarzung über den ganzen Spektralbereich zu erkennen. Die Anreicherung von Stoffen bis zu Konzentrationen, die über dem Durchmesser von 2 u

liegen und deren Bindung an gewisse Zellstrukturen scheint, wie oben schon erwähnt, für nur wenige Substanzgruppen zuzutreffen; als Beispiel sei hier wieder das Carmin angeführt, das offensichtlich in ganz bestimmten Strukturen der Tubulusepithelzellen und der Kupffer'schen Sternzellen in diesen Konzentrationen gespeichert wird. Hier läßt sich in allen drei Absorptionsmaxima die Schwärzung im UV.-Mikroskop nachweisen, über die Art der Strukturbindung läßt sich dagegen keine Aussage machen.

Die zweite Anwendungsmöglichkeit des UV.-Mikroskopes, nämlich die Beobachtung von Veränderungen und Verschiebungen der Nukleinsäurekonzentration im Cytoplasma und Kern unter der Einwirkung von Pharmaka scheint dagegen mehr Erfolg zu versprechen. Die Nukleinsäuren (DNS, RNS) sind in ihrem Gehalt und in ihrer Lokalisation im Cytoplasma und Kern nach den bisher durchgeführten Untersuchungen deutlichen Veränderungen unterworfen, besonders auffällig sind die Veränderungen der Nukleoli im Verlauf der chronischen Einwirkung von Narkotica (Trapanal, Trapanal-Halothan); die Nukleoli vergrößern sich hierbei sehr stark und nehmen in ihrer Zahl ab (Abb. 28), die Intensität der Absorptionsschwärzung hingegen nimmt deutlich zu, sodaß auch in den Banden, die nicht mehr im Absorptionsmaximum liegen, noch Schwärzungen beobachtet werden. Ob hierbei die Grundabsorption mit erhöht ist oder es sich um eine echte Konzentrationserhöhung der RNS in den Nukleoli handelt, kann zunächst nicht eindeutig entschieden werden (Abb. 29). Für eine Zunahme der RNS spricht, daß in dem Bereich über 300 m μ in den Nukleoli keine Zunahme oder Fortbestehen der Grundschwärzung festzustellen ist, was bei unspezifischer Absorption der Fall sein müßte. Lichtmikroskopische Beobachtungen an Schnitten, die mit PAS-Reaktion behandelt wurden, zeigten eine leicht rötlich-violette Verfärbung der Nukleoli, vermutlich durch Schiff'sche Basenbindung mit dem Ribosomolekül. Diese rötliche Verfärbung tritt bei Kontrollen durch die überwiegende Mämalanfärbung nicht so hervor, dies spricht für eine Zunahme der RNS im Nukleolus. Der letzte Beweis müßte durch Verdauungsversuche mit Ribonuklease erbracht werden. Eine Deutung der auffallend starken Absorptionsschwärzung der Nukleoli bei 280 m μ ist schwierig, u.U. sind hier tyrosin-, tryptophan- und phenylalaninhaltige Proteine, die ja bei 280 m μ maximal absorbieren, mit für die anhaltende Schwärzung bei 280 m μ verantwortlich zu machen.

Weitere Versuche, das ebenfalls bei 260 m μ maximal absorbierende ATP in der quergestreiften Muskulatur zu lokalisieren und nachzuweisen, schlugen leider bis jetzt fehl.

V. Zusammenfassung

Untersuchungen an dem UV.-Mikroskop der Firma Leitz ergaben folgende Befunde:

1. Eine wäßrige 9,09 %ige Chloralhydrat-Glycerinlösung erwies sich wegen der geringen Streustrahlung, die auf einen optimalen Brechungsindex schließen läßt, als bisher bestes Eindeckungsmittel.
2. Es wurden ultraviolettabsorbierende körperfremde Substanzen in den Tubulusepithelien der Niere, in den Kupffer'schen Sternzellen und in den Leberzellen uv.-mikroskopisch nachgewiesen.
3. Verschiebungen im Nukleinsäuregehalt der Leberzellkerne wurden unter der chronischen Einwirkung von Narkotica beobachtet.
4. Ein Nachweis des bei 260 m μ maximal absorbierenden ATP's in der Querstreifung der Muskulatur war nicht möglich.

LITERATUR - VERZEICHNIS

DIEMER, K. Fr.: "Untersuchungen zur Verwendung des Ultraviolettmikroskopes für pharmakologische Probleme". Med. Inauguraldissertation, Marburg 1962.

PREIS, C.: Histometrische Untersuchungen über die pharmakologisch induzierte Lebervergrößerung der weißen Maus. Inaug. Diss., Marburg 1964.

SANDRITTER, W.: Acta histochemica, Bd. 9, S. 192 (1960).

SCHAUDE: Unveröffentlichte Versuche.

SIESS, M., SCHMIDT, B., OEHMIG, H. und KIRCHNER, E.:
Bruns' Beiträge zur klinischen Chirurgie, Bd. 206, H. 4 (1963),
Verl. Urban und Schwarzenberg.

SUZUKI, T.: Zur Morphologie der Nierensekretion, S. 3 (1912).

TIRM, F. und ARNOLD, M.: Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmacol.,
Bd. 235: Histochemische Untersuchungen über den Verbleib von
Quecksilber-Diuretica und ihren Cysteinderivaten in der Ratten-
niere.

Lebenslauf

Am 16. August 1938 wurde ich als zweiter Sohn des Anstomem Dr. Klaus Miessing und seiner Ehefrau Lydia geb. Wieler in Kiel geboren. Meine Kindheit verlebte ich in Kiel, Freiburg, Leipzig und Marburg. Nach vier Jahren Grundschule in Leipzig und Marburg besuchte ich neun Jahre die Privatschule "Steinmühle" bei Marburg. Nach bestandenen Abitur im Frühjahr 1959 studierte ich bis zur ärztlichen Vorprüfung 5 Semester in Marburg, danach jeweils ein Semester an den Universitäten München und Freiburg. Seit November 1962 arbeite ich im Pharmakologischen Institut an meiner Dissertation. Das Staatsexamen beendete ich am 5. 2. 1965.

Meine akademischen Lehrer waren:

In Marburg:

Prof.Dr. Beckmann	Prof.Dr. Jacob	Prof.Dr. Schmitz
Prof.Dr. Berendes	Prof.Dr. Kessler	Doz. Dr. Schleier
Prof.Dr. Bickel	Prof.Dr. Lang	Prof.Dr. Schmid
Prof.Dr. Braun-Falco	Prof.Dr. Linneweh	Prof.Dr. Scholmerich
Prof.Dr. Bücher	Prof.Dr. Lübbers	Prof.Dr. Schwaiger
Prof.Dr. Dimroth	Prof.Dr. Mahr	Prof.Dr. Seidel
Prof.Dr. Gedigk	Doz. Dr. Marx	Prof.Dr. Siegert
Prof.Dr. Hamm	Prof.Dr. Mattes	Prof.Dr. Siess
Prof.Dr. Hartmann	Prof.Dr. du Mesnil d.R.	Prof.Dr. Straub
Prof.Dr. Hensel	Prof.Dr. Neubauer	Prof.Dr. Streicher
Doz. Dr. Hildebrandt	Prof.Dr. Miessing	Prof.Dr. Vogt
Doz. Dr. Hornung	Doz. Dr. Oksche	Prof.Dr. Walcher
Prof.Dr. Huber	Prof.Dr. Petry	Prof.Dr. Wendt
		Prof.Dr. Würtlerle

In München:

Prof.Dr. Bauer	Prof.Dr. Dentenwill	Prof.Dr. Eyer
Prof.Dr. Bodechtel	Prof.Dr. Eder	Prof.Dr. Lenker

In Freiburg:

Prof.Dr. Bätzner	Prof.Dr. Heilmeyer	Prof.Dr. Krauss
Prof.Dr. Nahn	Prof.Dr. Hillemanns	Prof.Dr. Koslowski
		Prof.Dr. Rehm

